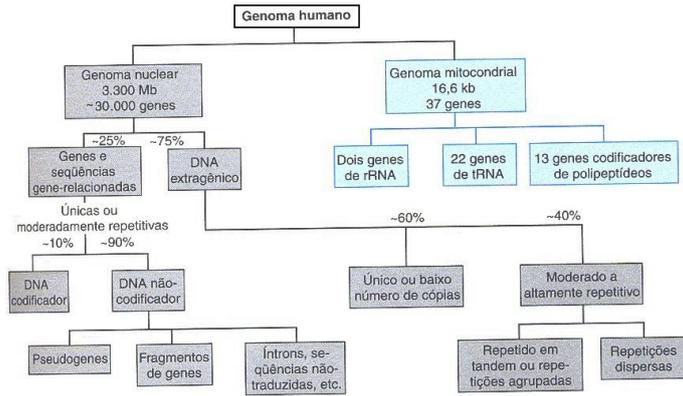
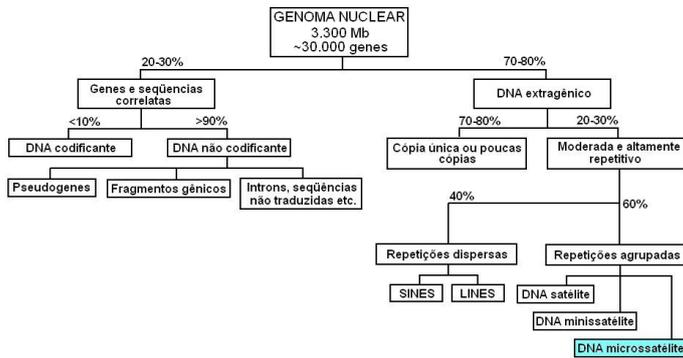


AS IMPRESSÕES DIGITAIS DO DNA (DNA FINGERPRINTS)

GENOMA HUMANO – ESTRUTURA



GENOMA NUCLEAR



MICROSSATÉLITES

- † Seqüências hipervariáveis (também chamadas polimórficas) repetitivas de 1 a 4 pb com distribuição ao longo do genoma.
- † O polimorfismo destas seqüências é resultado de diferentes rearranjos envolvendo segmentos de DNA de tamanhos diferentes.
- † Herança Mendeliana (os filhos sempre recebem metade dos alelos de origem materna e metade de origem paterna).
- † Exemplos de seqüências de microssatélites:

- Repetição de 1 base:
GTAAAAAAGGAT
- Repetição de 2 bases:
GTACACACACACAGGAT (dinucleotídeo)
- Repetição de 3 bases:
GTACCACCACCACCGGAT (trinucleotídeo)
- Repetição de 4 bases:
GTGAGACAGACAGAGGAT (tetranucleotídeo)

- † Polimorfismo são devido a diferenças no número de repetições.
- † São também conhecidos como "short tandem repeat" (STR).

IMPRESSÕES DIGITAIS DO DNA (DNA FINGERPRINTS)

- O QUE SIGNIFICA? -

- † Com base no estudo de uma bateria de 12-20 microssatélites, é possível obter perfis genéticos praticamente indivíduo-específicos, muito úteis na investigação de paternidade, identificação de vítimas e criminosos.

- TÉCNICAS -

- † RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).
- † PCR (Polymerase Chain Reaction).

RFLP

† Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição:

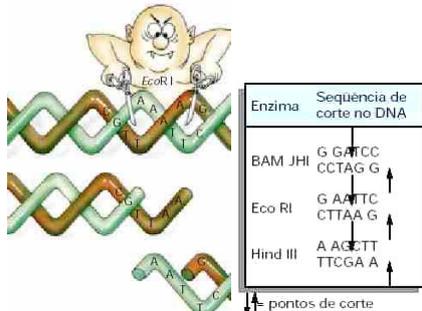
- 1) Coleta de amostras biológicas que podem ser saliva, sangue, esperma e cabelo, entre outros.



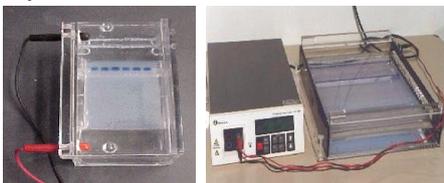
- 2) Extração e purificação do DNA.



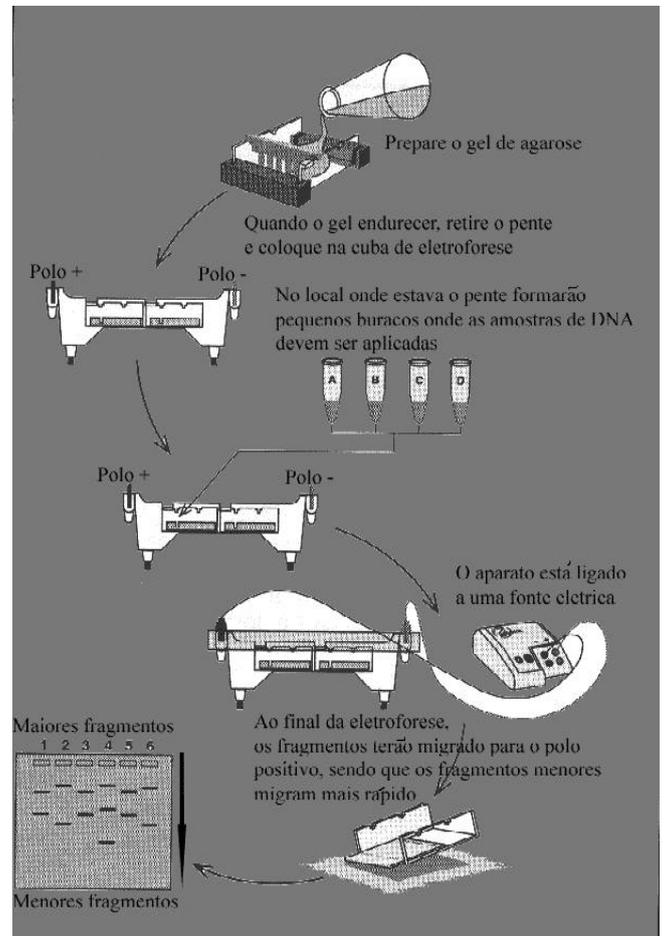
- 3) Corte com enzimas de restrição (tesouras moleculares que reconhecem e cortam seqüências específicas do DNA).



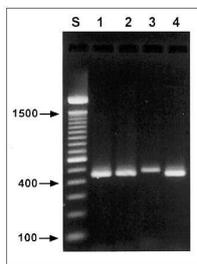
- 4) **Eletroforese:** onde, através de uma corrente elétrica, são separados os fragmentos de DNA por tamanho. A partir daí, é formada uma espécie de código de barras que é a identificação individual e intransferível de cada indivíduo.



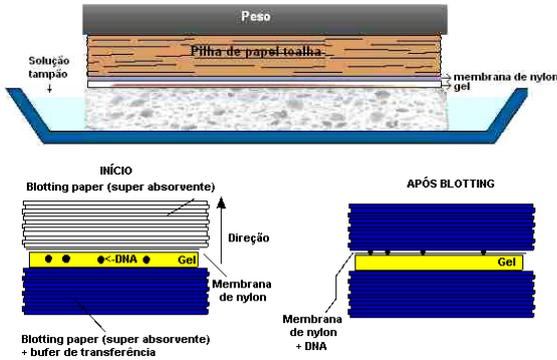
Eletroforese em gel de agarose



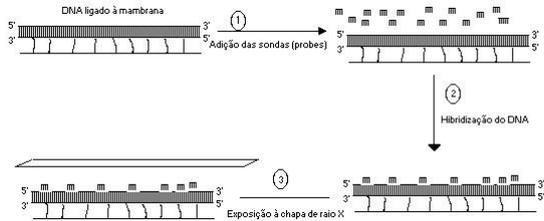
VISUALIZAÇÃO DO DNA



5) Transferência para membrana de nylon (*southern blotting*).

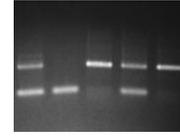


6) Uso de sondas: pequenos segmentos de DNA radioativados, cuja seqüência de bases é conhecida. Acoplam-se às seqüências de DNA das quais são complementares, ligando-se às mesmas.

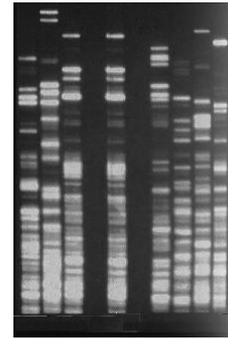


♣ SONDAS : SLP (*single-locus probe*) e MLP (*multi-locus-probe*).

♣ **SLP**: detecta um único segmento de DNA repetitivo em um único cromossomo. Seu uso resulta em um padrão que contém no máximo duas bandas: uma para cada segmento de DNA reconhecido em cada membro do par de cromossomos homólogos. Para a obtenção de padrões mais característicos de cada pessoa, são necessárias várias sondas. Devido à sua sensibilidade, são empregadas nas investigações criminais.

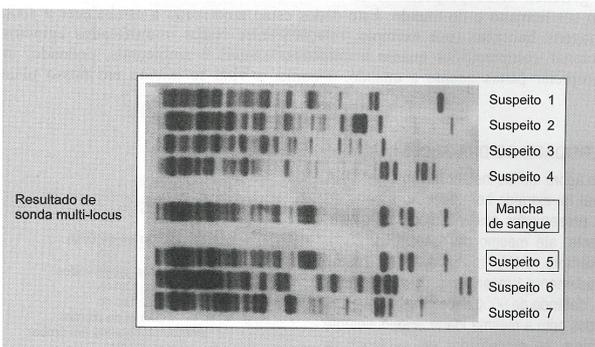


♣ **MLP**: detecta vários segmentos de DNA repetitivo localizados em muitos cromossomos. O padrão obtido consiste em aproximadamente 20 a 30 bandas. Por isso, a probabilidade de duas pessoas tomadas ao acaso apresentarem todas as bandas exatamente com a mesma posição é extremamente baixa (1:10 trilhões).

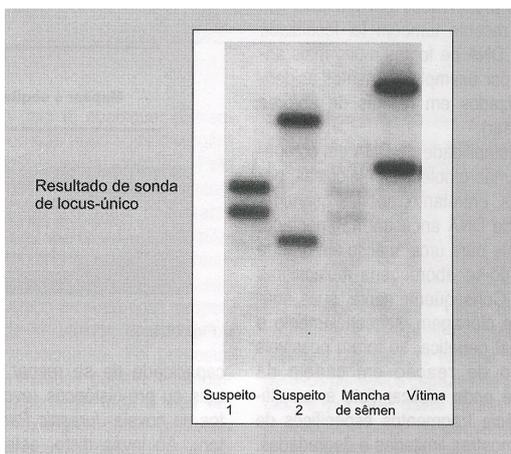


† RESULTADO DO TESTE

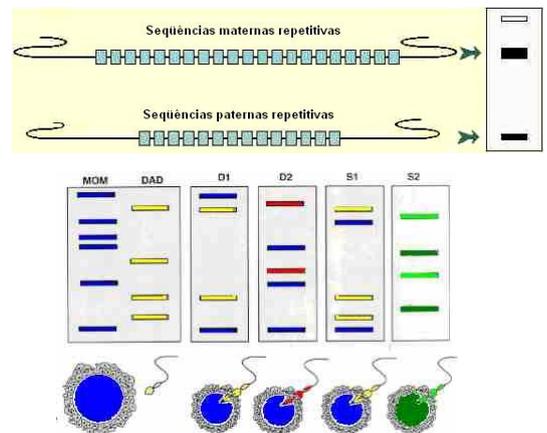
♣ 1- Análise forense: assassinato



♣ 2- Análise forense: estupro



♣ 3- Paternidade:



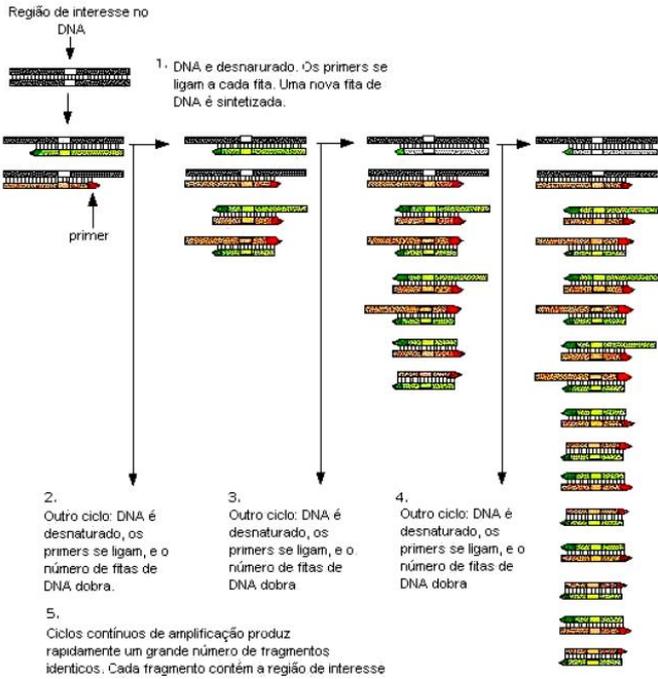
A simulação acima demonstra que, biologicamente, há apenas um filho e uma filha do casal.

Pat 1	Pat 2	Pat 3	Filho	Mãe
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—

No caso acima, a mãe não sabe quem é o pai biológico.

PCR

† **Reação em Cadeia da Polimerase:** permite que um fragmento específico da molécula de DNA seja amplificado milhares de vezes em apenas algumas horas.



† A partir da PCR é possível obter-se cópias de uma parte do material genético em quantidade suficiente que permita detectar e analisar a seqüência que é alvo do estudo.

† Durante o processo, o DNA original é copiado por uma enzima, a DNA-polimerase, que duplica uma pequena parte da molécula de DNA.

† Parte a ser duplicada é selecionada por dois iniciadores (*primers*) \mathcal{A} oligonucleotídeos sintéticos de RNA, complementares ao DNA fita-molde \mathcal{A} combinam-se exatamente com cada região terminal da parte a ser copiada.

† Máquina de PCR (termociclador) \mathcal{A} é basicamente um forno controlado por computador, onde um programa controla o tempo e a temperatura.



VANTAGENS:

† Permite a amplificação de qualquer seqüência de DNA coletada de amostras de materiais biológicos como sangue, urina, outros fluidos corporais, cabelo e fragmentos teciduais.

† Amostras de microorganismos, células vegetais ou animais mesmo que com milhares de anos, também podem ser detectadas pela PCR.

ETAPAS:

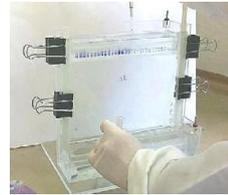
1- Extração do DNA da amostra que se pretende estudar.

2- Purificação do DNA.

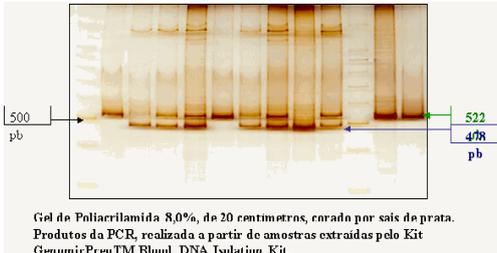
3- Preparação de uma mistura chamada *Master Mix*, que conterá todas as substâncias necessárias à síntese de novas cópias de DNA.

4- Incubação em um termociclador, que é o aparelho responsável pela execução de todos os ciclos da reação, aquecendo e resfriando os tubos.

5- Eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos da PCR.



6- Revelação e fixação do gel.



TERMOCICLADOR (ETAPAS):

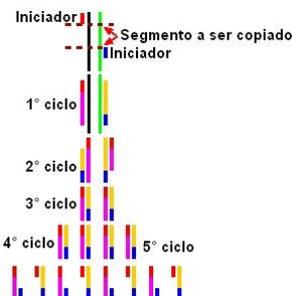
† Reação se processa em ciclos de diferentes temperaturas \mathcal{A} ~30 ciclos \mathcal{A} síntese exponencial de moléculas de DNA.

† Etapas de cada ciclo:

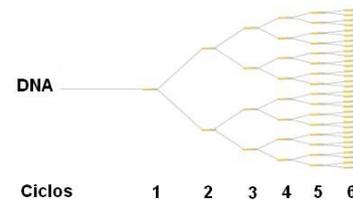
1- **Desnaturação** (94-95°C por 5 minutos) \mathcal{A} separação do DNA-molde dupla fita em duas fitas simples de DNA.

2- **Pareamento ("Annealing" ou anelamento)** (55-60°C) \mathcal{A} iniciadores ligam-se ao DNA fita simples. O tempo necessário para o anelamento é de 30-45 segundos.

3- **Extensão** (72°C) \mathcal{A} DNA-polimerase termoestável (taq-polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus*) adiciona nucleotídeos \mathcal{A} polimerização \mathcal{A} cada uma das novas fitas extendidas a partir dos iniciadores serve de molde para a síntese de novas fitas.



† Cada ciclo dobra o número de cópias do DNA dupla fita.



† Número de ciclos adequado: 30 (até o 3º ciclo não há produtos; número de ciclos maior do que 35 tem pouco efeito positivo \mathcal{A} mutações).

† RESULTADO DO TESTE

✦ 1- **Análise forense:** estupro

– Mary Higgins foi violentada no Central Park em Nova York. Três suspeitos foram presos. O DNA revelou o verdadeiro agressor.

Suspeito 1	Suspeito 2	Suspeito 3	Evidência 1	Evidência 2
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—

As evidências (sangue do agressor e um fio de cabelo) foram usadas no teste para achar o culpado. O indivíduo 2 foi condenado.

♣ **2- Análise forense:** um crime (quase) perfeito.

– Uma esposa desaparecida. Um marido desesperado. Ingredientes de uma trama quase perfeita para eliminar uma pessoa. Phillippe Landmeier tinha planejado tudo. Só não contava que oito anos depois o seu crime viria à tona.



Filho 1	Filho 2	Filho 3	Evidência 1	Cabelo	Pai
—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—



Phillipe aguarda a execução desde 1995.

♣ **3- Análise forense:** o assassinato de JonBennet Ramsey: um crime sem solução?

Pai	Mãe	JonBennet	Evidência 1	Evidência 2
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—



A morte da inocência.



Tristeza ou remorso?

♣ **4- Análise forense:** o assassino de Rodman Dam, 1987.

– 1987: casal de noivos – Matthew Brock e Kelly Lynn Perry (também estuprada) - é achado baleado na cabeça (bala de rifle calibre 30) em Rodman Dam, área de recreação na Flórida.

– Principais suspeitos: os adolescentes Randall Scott Jones e Chris Reesh.

